



ISSN 1676 - 1340

Dezembro, 2002

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 36

Redução da patogenicidade de um mutante de AgMNPV por indução de apoptose em larvas de *Anticarsia gemmatalis*

Maria Elita Batista de Castro
Elisa Filgueiras Soares
Cláudia Brod Siqueira
Marlinda Lobo de Souza
Bergmann Morais Ribeiro

Brasília, DF
2002

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W5 Norte (Final) - Brasília, DF

CEP 70770-900 - Caixa Postal 02372

PABX: (61) 448-4600

Fax: (61) 340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias

Secretária-Executiva: Miraci de Arruda Camara Pontual

Membros: Antônio Costa Allem

Marcos Rodrigues de Faria

Marta Aguiar Sabo Mendes

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares Campos Carneiro

Suplentes: Edson Junqueira Leite

José Roberto de Alencar Moreira

Supervisor Editorial: Miraci de Arruda Camara Pontual

Revisor de texto: Felisberto de Almeida

Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi

Tratamento de Ilustrações: Alysson Messias da Silva

Editoração Eletrônica: Alysson Messias da Silva

Capa: Alysson Messias da Silva

1ª edição

1ª impressão (2002): tiragem 150

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Redução da patogenicidade de um mutante de AgMNPV por indução de apoptose em larvas de *Anticarsia gemmatalis* / Maria Elita Batista de Castro... [et al.]. - Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002.

15 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340; n.36)

1. *Anticarsia gemmatalis* 2. Vírus de inseto.
3. Patogenicidade - Vírus. I. Castro, Maria Elita Batista de. II. Série.

579.2 CDD 21

© Embrapa 2002

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	9
Materiais e Métodos	10
Resultados e Discussão	11
Referências Bibliográficas	14

Redução da patogenicidade de um mutante de AgMNPV por indução de apoptose em larvas de *Anticarsia gemmatalis*

*Maria Elita Batista de Castro*¹

*Elisa Filgueiras Soares*²

*Cláudia Brod Siqueira*³

*Marlinda Lobo de Souza*¹

*Bergmann Morais Ribeiro*⁴

Resumo

Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) é um baculovirus amplamente utilizado como biopesticida no controle da lagarta da soja (*A. gemmatalis*). Recentemente, foi obtido um mutante deste vírus, denominado de vApAg, que induz a morte prematura de células de *A. gemmatalis* (UFL-AG-286). Para avaliar a infectividade do vApAg em comparação ao vírus selvagem AgMNPV, foram realizados bioensaios para determinar a taxa de mortalidade das larvas e a concentração letal média dos vírus (CL50). Trinta larvas de 3º instar foram tratadas com cinco concentrações virais diferentes ($5,0 \times 10^2$; $1,5 \times 10^3$; $4,5 \times 10^3$; $1,35 \times 10^4$ e $4,05 \times 10^4$ PIBs/ml) utilizando-se, como inóculo, 0,15ml de cada concentração distribuído uniformemente sobre a superfície da dieta artificial (5ml). O controle consistia em larvas alimentadas com dieta artificial não tratada. As larvas foram observadas diariamente a partir do quarto dia após a inoculação até o estágio de pré-pupa. A concentração letal e os limites fiduciais foram obtidos por análise de Probit (Finney, 1971). A concentração letal (CL_{50}) foi 3748,67 PIBs/ml para vApAg e 767,33 PIBs/ml para AgMNPV, indicando que o mutante precisa de uma

¹ Bióloga, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

² Graduanda em Biologia, Universidade de Brasília. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

³ Eng^o. Agr^o., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁴ Biólogo, PhD, Universidade de Brasília.

concentração de aproximadamente cinco vezes maior do que a observada para AgMNPV. Apesar do vírus mutante ter uma infectividade reduzida em *A. gemmatalis*, o tempo necessário para matar essas larvas foi similar ao do vírus selvagem. O tempo médio de morte (TD) foi 9,45 e 9,19 dias para vApAg e AgMNPV, respectivamente. A infectividade reduzida do vírus mutante pode estar relacionada a alterações e degradações nos tecidos do inseto devido à ausência de genes inibidores de apoptose (ou ausência de sua expressão) no genoma de vApAg. Em estudos recentes, nós mostramos que em sistemas de cultura de células o mutante vApAg induz intensa apoptose em células de *A. gemmatalis* (UFL-AG-286) e elas se tornam incapazes de suportar uma infecção produtiva completa, como pode ser evidenciado pela quase total ausência de corpos de oclusão. Entretanto, a evidência direta *in vivo*, como a observação de apoptose em tecidos larvais e a correlação com a baixa infectividade, ainda precisa ser investigada.

Pathogenicity reduction of an AgMNPV mutant by apoptosis induction in *Anticarsia gemmatalis* larvae

Abstract

Recently, an *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus mutant, vApAg, which induces apoptotic cell death in *Anticarsia gemmatalis* cells (UFL-AG-286), was found. To evaluate the infectivity of the vApAg mutant in comparison to the wild type virus, AgMNPV, in vivo assays were carried out to determine the larval mortality and the median lethal concentration of the virus (LC_{50}). Thirty 3rd instar larvae were treated with each trial being replicated three times. Treatments consisted of five virus concentrations (5.0×10^2 ; 1.5×10^3 ; 4.5×10^3 ; 1.35×10^4 and 4.05×10^4 PIBs/ml) and 0.15ml of each dose was uniformly distributed on the surface of the diet (5ml). Controls consisted of insects fed on untreated diet. Larvae were observed daily for mortality from 4th day after exposure to virus until the prepupal stage. The concentration-mortality and fiducial limits were obtained by Probit analysis. The median lethal concentration (LC_{50}) was 767.33 PIBs/ml for vApAg and 3748.67 PIBs/ml for AgMNPV, indicating that the mutant requires about a five times higher concentration than that observed for the wild type virus to kill the insect. This lower infectivity may be related to alterations and degradation of insect tissues due to absence of apoptosis-inhibiting genes (*iap* genes) in the vApAg genome. Despite the fact that the mutant virus has reduced infectivity in *A. gemmatalis*, the time required to kill those larvae that became infected was no different from the wild type virus. The mean time to death (TD) was 9.45 and 9.19 days for the vApAg and the wild type virus, respectively. In previous studies using cell culture systems we had shown that the vApAg mutant induces intense apoptosis in *A. gemmatalis*

cells (UFL-AG-286) and they became unable to support a fully productive infection, evidenced by almost complete absence of occlusion bodies. However in vivo direct evidence, such as an observation of apoptosis in larval tissues and correlation with the reduction in infectivity, still needs to be shown.

Introdução

A apoptose é um tipo de morte celular programada geneticamente que ocorre em células de organismos multicelulares provocando auto-destruição que pode ser desencadeada devido a vários estímulos, como por exemplo em células de inseto que são submetidas à infecção de vírus (Clem, 1997). Vírus precisam de hospedeiros para se multiplicar e a indução de apoptose em células hospedeiras pode reduzir ou até eliminar a produção e a distribuição da progênie viral. Assim, os vírus desenvolveram estratégias para evitar ou atrasar a apoptose celular. Além disso, alguns vírus induzem a apoptose em estágios tardios da infecção, o que representa um passo importante na propagação da progênie para células vizinhas enquanto evita ainda a reposta inflamatória do hospedeiro protegendo o vírus contra as enzimas e os anticorpos (Teodoro & Branton, 1997).

Espécies da família Baculoviridae possuem genes que podem inibir a apoptose em células hospedeiras, o que traz vantagens significativas no processo de infecção. *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNPV), por exemplo, possui um gene inibidor de apoptose (*p35*) e, conforme relatam Clem e colaboradores (1991, 1993), esse vírus se replica produtivamente em células de *Spodoptera frugiperda* SF-21. No entanto, para os mutantes de AcMNPV, que não possuem o gene *p35*, foi observado que a infecção nessas células SF-21 teve uma produção de progênie viral significativamente mais baixa comparada com o vírus selvagem. Análises *in vivo* revelaram que mutantes *p35* necessitam de uma dose 1000 vezes maior para obter 50% de mortalidade de larvas *S. frugiperda* do que para vírus selvagem ou revertentes. Porém, em células de *Trichoplusia ni*, linhagem TN-368, e em larvas *T. ni*, o vírus mutante foi equivalente ao selvagem em relação à infecção e replicação (Clem et al., 1993).

Outro grupo de genes de baculovirus que inibem a apoptose são os genes *iap*. Eles foram descobertos a partir de experimentos de “marker rescue” usando DNA do vírus vAcAnh (AcMNPV com deleção no gene *p35*) e fragmentos de DNA de outros baculovirus (Croock et al., 1993). Embora os genes, *p35* e *iap*, sejam capazes de bloquear a apoptose, parece que operam por diferentes caminhos não sendo notada homologia entre em suas sequências.

Atualmente, um vírus amplamente utilizado como bioinseticida no Brasil é o *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus – AgMNPV, do gênero

Nucleopolyhedrovirus (NPV), família Baculoviridae,. É um vírus específico da lagarta-da-soja. A patologia desse baculovirus atinge principalmente os estágios larvais do inseto e sua principal rota de infecção é pela ingestão de poliedros, que atravessam o epitélio intestinal e se multiplicam nessas células progredindo por todo o corpo do inseto resultando numa infecção sistêmica. Também em sistemas *in vitro*, células de *A. gemmatalis* e de *T. ni*, esse vírus replica gerando uma infecção altamente produtiva (Castro et al., 2001).

Recentemente, durante a construção de um recombinante de AgMNPV, foi descoberto um mutante, que denominamos de vApAg, que induz lise prematura em células de *A. gemmatalis* (UFL-AG-286) bloqueando o processo de infecção e que se replica normalmente em *T. ni* (BTI-Tn-5B1-4) produzindo grande número de poliedros (Silveira et al., 1999; Castro & Ribeiro, 2000, 2001; Carpes et al., 2000). Para identificar que gene ou genes são responsáveis pela ocorrência ou não de apoptose, o vírus tipo selvagem, AgMNPV, foi então utilizado e um gene anti-apoptótico foi localizado em seu genoma. Este gene, denominado *iap-3*, foi clonado e sequenciado para estudos de caracterização. Em continuidade, demonstramos que a apoptose induzida por vApAg pode ser atribuída à expressão limitada ou nula desse gene. Genes anti-apoptóticos podem estar inativados, deletados ou sob regulação alterada. No momento foi confirmado, por sequenciamento, que o gene *iap* no mutante vApAg está interrompido por um transposon presente nas células de *A. gemmatalis* (Carpes et al. 2002).

Como contribuição aos estudos de caracterização do vírus mutante vApAg, neste trabalho são apresentados ensaios de avaliação de patogenicidade realizados com larvas de *Anticarsia gemmatalis* infectadas com diferentes concentrações virais. Os parâmetros percentual de mortalidade, CL_{50} , TL_{50} e TM foram determinados.

Materiais e Métodos

Para realização dos bioensaios, larvas mortas por infecção com AgMNPV-2D e vApAg foram maceradas em tampão de homogeneização e filtradas em gaze e lã de vidro. O filtrado foi centrifugado, e o sedimento ressuspensão em água destilada e armazenado a -20°C . Poliedros purificados a partir de larvas infectadas mortas foram então utilizados em bioensaios, onde foram testados cinco tratamentos para cada vírus nas seguintes concentrações: $5,0 \times 10^2$;

1,5x10³; 4,5x10³; 1,35x10⁴; 4,05x10⁴ PIBs/ml. Cada tratamento constou de 30 larvas, sendo estas dispostas de três em três, em copos plásticos de 50ml contendo 5ml de dieta artificial preparada sem os conservantes formol e nipagin. Como inóculo viral, 150µl das concentrações citadas acima foram distribuídos na superfície da dieta artificial. Nos controles aplicou-se água destilada. As larvas foram mantidas em uma incubadora B.O.D., com temperatura entre 27°C a 28°C e fotoperíodo de 12 horas. Para avaliação da mortalidade, foram feitas observações diárias das larvas, a partir do quarto dia após a inoculação, até o estágio de pupa. Ao final dos bioensaios os dados foram analisados pelo programa MicroProbit 3.0 (análise de Probit - Finney, 1978) para determinação de CL50 (concentração letal 50 - concentração de vírus capaz de matar 50% dos insetos testados em um bioensaio) e TL50 (tempo letal 50 - tempo que leva para o vírus matar 50% dos insetos testados em um bioensaio). Para se calcular o TM (tempo médio de morte - média do tempo necessário para que os insetos testados em um bioensaio morram), foi utilizada a fórmula descrita abaixo, onde D é o dia de avaliação e N é o número de larvas mortas pelo vírus nesse dia (Morales, 2001):

$$TM = \frac{\sum (D1 \times N1 + D2 \times N2 + D3 \times N3 + \dots Dn \times Nn)}{\text{Total de larvas mortas pelo vírus}}$$

Resultados e Discussão

Estudos de microscopia de luz e eletrônica de células de *A. gemmatalis* (UFL-AG-286) infectadas com o mutante vApAg sugerem que a mutação neste vírus deve ter ocorrido de forma que a apoptose é inibida na fase inicial, com produção de alguma progênie viral, e induzida na fase tardia da infecção, com formação de inúmeros corpos apoptóticos. Esses dados diferem dos obtidos com o mutante de AcMNPV (vP35del), em que o gene p35 desse vírus tem uma deleção que impede por completo a atividade da proteína P35 favorecendo a ocorrência de apoptose já na fase inicial da infecção (Silveira, et al, 1999). Análises da replicação de DNA, produção de partículas virais, e da síntese de proteínas também confirmam que o vírus mutante vApAg afeta os eventos tardios da infecção.

Neste trabalho, foram feitos estudos de infectividade do vírus mutante vApAg sistemas *in vivo*, e de acordo com os dados obtidos pela análise de Probit foi observada uma diferença significativa de mortalidade entre as larvas infectadas com os vírus selvagem e mutante. A concentração letal média (CL50) foi de 3748,67 PIBs/ml para o vírus mutante vApAg e de 767,33 PIBs/ml para o vírus selvagem (Tabela 1). Embora estes vírus tenham exibido, no tratamento em que se encontra a CL50, tempo médio de morte semelhantes entre si (TM = 9,45 dias para vApAg e TM = 9,19 dias para AgMNPV), os dados evidenciam que o vírus mutante necessita de uma concentração cinco vezes maior que o vírus selvagem para matar o inseto em um tempo equivalente após a inoculação.

Tabela 1. Concentração letal média e tempo médio de morte dos vírus AgMNPV-2D e vApAg, calculados pelo método de Probit.

Hospedeiro/ Vírus	*CL ₅₀ (PIB/ml)	Limites Fiduciais 95% (PIB/ml)	**TM (dias)
<i>A. gemmatalis</i> / AgMNPV-2D	767,33	219,33 - 1446,00	9,19
<i>A. gemmatalis</i> / vApAg	3748,67	1980,34 - 6670,34	9,45

*CL₅₀: concentração média de poliedros (PIBs/ml) necessária para matar 50% da população de insetos em teste. **TM: tempo médio de morte (dias) no tratamento onde se encontra a CL₅₀.

Da mesma forma, a análise quanto ao percentual de mortalidade de lagartas *Anticarsia gemmatalis* (Fig. 1), mostra que enquanto o vírus selvagem AgMNPV apresentou, já nas primeiras concentrações testadas, altos percentuais de mortalidade, 88% de lagartas mortas numa concentração de 4500 PIBs/ml, o vírus mutante vApAg, nesta mesma concentração, foi capaz de matar somente cerca de 50% das lagartas testadas.

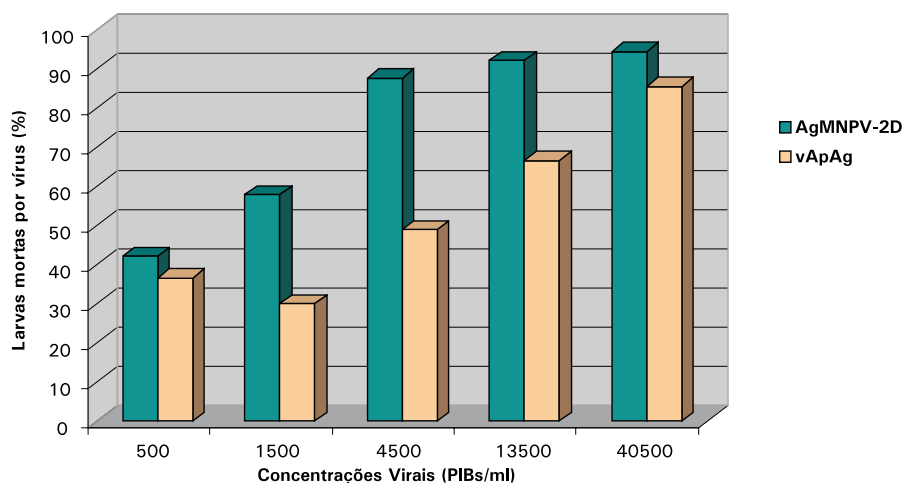


Fig. 1. Mortalidade de larvas *A. gemmatalis* infectadas pelos vírus AgMNPV-2D e vApAg nas diferentes concentrações de poliedros. As porcentagens correspondem ao número acumulado de larvas mortas durante 15 dias de observação do bioensaio.

Verificando-se a Tabela 2, o tempo letal médio (TL50) observado em cada tratamento de ambos os vírus mostra que o mutante sempre requer um maior número de dias para matar 50% da população.

Tabela 2. Tempo letal médio (dias) dos vírus AgMNPV-2D e vApAg, calculado pelo método de Probit.

Concentrações Virais (PIB/ml)	TL ₅₀ (dias)	AgMNPV-2D		TL ₅₀ (dias)	vApAg	
		Limites Fiduciais 95% (PIB/ml)	Limites Fiduciais 95%(PIB/ml)			
500	15,52	14,12 – 17,76	15,69	14,51 – 17,47		
1500	12,44	11,45 – 13,95	16,63	14,96 – 19,54		
4500	8,94	8,31 – 9,71	13,46	12,23 – 15,36		
13500	8,10	7,50 – 8,90	11,22	10,50 – 12,13		
40500	6,58	6,21 – 6,99	9,16	8,45 – 10,07		

Portanto, esses resultados indicam que o vírus mutante vApAg apresenta uma menor infectividade em relação ao vírus selvagem. Isto poderia ser decorrente de alterações de tecidos do inseto, devido a alterações nos genes virais inibidores de apoptose (genes *iap* ou relacionados) dificultando a progressão da infecção viral. Em estudos de sequenciamento ficou evidenciada uma alteração no gene *iap-3* do mutante vApAg pela inserção de um transposon presente nas células de *A. gemmatalis* (Carpes et al. 2002).

Trabalhos realizados recentemente, usando sistemas *in vitro*, mostram que o vírus mutante induz uma intensa apoptose em células de *A. gemmatalis* (UFL-AG-286) e fica incapacitado de realizar uma infecção completamente produtiva. Entretanto, certos aspectos da infecção do mutante vApAg *in vivo*, como a observação de apoptose em tecidos larvais e a correlação com a redução da infectividade, ainda necessitam de evidências.

Apoio Financeiro: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CNPq-Pronex.

Referências Bibliográficas

CARPES, M. P.; CASTRO, M. E. B. & RIBEIRO, B. M. (2000). Cloning and partial sequencing of a putative *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) inhibitor of apoptosis gene (*iap-3*). XI Encontro Nacional de Virologia. 3º Encontro de Virologia do Mercosul. 25-29 novembro, 2000. São Lourenço, MG, Brasil. Journal of the Brazilian Society for Virology. *Virus: Reviews and Research*, vol. 05, nº 2, Supplement 1, (BA 27). p. 75.

CARPES, M. P., CASTRO, M. E. B., SOARES, E. F., VILLELA, A. G., RIBEIRO, B. M. (2002). Characterization of the *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) inhibitor of apoptosis gene (*iap-3*) and the mutant vApAg. XII Encontro Nacional de Virologia. 30 setembro a 03 outubro, 2002, Águas de Lindóia, SP, Brasil. *Virus: Reviews & Research*, vol. 07, nº 1, (IV 1). p.128.

CASTRO, M.E.B. & RIBEIRO, B.M. (2001). Production of viral progenie in insect cells undergoing apptosis induced by a mutant *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. *Microbiological Research* 156(4): 369-376.

CASTRO, M.E.B. & RIBEIRO, B.M. (2000). vApAg, um mutante do nucleopoliedrovirus de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV), induz apoptose em células de *A. gemmatalis*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 36p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa, 13).

CLEM, R.J., FECHHEIMER, M. & MILLER, L.K. (1991). Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science* 254, 1388-1390.

CLEM, R. J. (1997). Regulation of programmed cell death by baculoviruses. In: The baculoviruses. (L. K. Miller, Ed.), Plenum press. New York, 237-266.

CLEM, R. J. & MILLER, L. K. (1993). Apoptosis reduces both the in vitro replication and the in vivo infectivity of a baculovirus. *Journal of Virology* 67(7): 3730-3738.

CROOK, N. E., CLEM, R. J. & MILLER, L. K. (1993). An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *Journal of Virology* 67: 2168-2174.

FINNEY, D. J. (1971). "**Probit Analysis**". Cambridge Univ. Press, Cambridge, England.

MORALES, L., MOSCARDI, F. SOSA-GÓMEZ, D. R., PARO, F. E. & SOLDORIO, I. L. (2001). Fluorescent brighteners improve *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) activity on AgMNPV-susceptible and resistant strains of the insect. *Biological Control* 20, 247-253.

SILVEIRA, E. B., RIBEIRO, B.M., BÁO, S. N. (1999). Morphological studies of apoptosis in insect cells infected with vApAg, an *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus mutant. *Journal of Submicroscopical and Cytological Pathology* 31(4): 1-12.

TEODORO, J. G., BRANTON, P. E. (1997). Regulation of apoptosis by viral gene products. *Journal of Virology* 71: 1739-1746.